

Research Article

**ANTI-RHEUMATOID ARTHRITIS EFFECT OF WATER FRACTION OF
SIWALAN FRUIT (*Borassus flabellifer* L.)
TO MICE INDUCED BY COMPLETE FREUND'S ADJUVANTS**

*I Ketut Adnyana, Elin Yulinah Sukandar, Wenny Indriasari
Bagian Farmakologi, Magister Farmasi Institut Teknologi Bandung
Jl. Ganesha 10, Bandung, 40132, Indonesia*

ABSTRACT

Background : Rheumatoid arthritis is a systemic autoimmune disorder, characterized by erosive arthritis in synovial joints and chronic symmetrical which causes severe dysfunction and disability. People used Siwalan (*Borassus flabellifer* L.) for antidiabetogenic, antipyretic, antiinflammation, immunosuppressive, antibacterial and fertility for a man. **Objective:** to determine the anti-rheumatoid arthritis activity of the water fraction fruit siwalan in mice models Rheumatoid Arthritis. **Methods:** Mice induced intraplantar with Complete Freund's adjuvants on the right foot with a dose of 0.25 ml / animal. Grouping animals were divided into 5 treatment groups, the control group (CFA), the comparison group (methylprednisolone), water fraction group I (dose 22.82 mg / kg), the water fraction II (dose 89.1 mg / kg). Methylprednisolone and water fraction for all dose are given for 20 days. Data were taken on days 1, 5, 10, 15 and 21. The parameters are swelling volume, ankle diameter, scoring macroscopic and back limb histological using Hematoxyllin-eosin staining. **Results:** Results of data processing using one-way ANOVA on the 15th day of the swelling volume, there were significant differences ($p < 0.05$) between the control group and comparison. There is a trend toward reduction in the swelling volume of water fraction group dose I ($0,054 \text{ ml} \pm 0,0056$) and dose II ($0,055 \text{ ml} \pm 0,0028$). In the rat foot diameter measurement the 15th day there are significant differences (95% confidence level) between the control group with the comparison group, the water fraction dose I and III. And there were no significant differences between the comparison groups with all water fraction group. This means that all water fraction group and the comparison group had the effect of decreasing the diameter of the ankle as well. For data analysis macroscopic scoring on the 15th day there are significant differences (Asymp. Sig. < 0.05) between the control group with the comparison group, the water fraction dose II. There were no significant differences between the comparison groups with the water fraction dose group I (22.28 mg / kb mm) and II (89.1 mg / kg bw). **Conclusion:** Water fraction of siwalan has an anti-rheumatoid arthritis in mouse models of rheumatoid arthritis induced by CFA.

Key words : Complete Freund's Adjuvants (CFA), Siwalan, *Borassus flabellifer* L., Rheumatoid Arthritis, inflammation, macroscopic scoring

Research Article

UJI EFEK ANTI-ARTRITIS REUMATOID FRAKSI AIR BUAH SIWALAN (*Borassus flabellifer* L.) PADA TIKUS YANG DIINDUKSI COMPLETE FREUND'S ADJUVANTS

*I Ketut Adnyana, Elin Yulinah Sukandar, Wenny Indriasari
Bagian Farmakologi, Magister Farmasi Institut Teknologi Bandung
Jl. Ganesha 10, Bandung, 40132, Indonesia*

ABSTRAK

Latar belakang : *Artritis reumatoid*, gangguan autoimun sistemik, ditandai artritis erosif sendi sinovial simetris dan kronis menyebabkan disfungsi serta kecacatan. Siwalan, tanaman tropik, berefek antiinflamasi. **Tujuan**: mengetahui efek anti-artritis reumatoid fraksi air buah siwalan pada tikus model artritis reumatoid. **Metode** : Hewan uji dibagi 5 kelompok: kelompok kontrol (CFA), pembanding (Metilprednisolon), kelompok fraksi air dosis I (22,82 mg/kg bb), dan II (89,1 mg/kg bb). Induksi dilakukan dengan Complete Freund's Adjuvants (CFA) 0,25 ml/hewan secara intraplantar kaki kanan. Parameter pengamatan adalah volume pembengkakan dan diameter pergelangan kaki kanan, skoring makroskopiknya dan pengamatan histologi. **Hasil**: Analisis dengan ANOVA satu arah hari ke-15 memperlihatkan perbedaan bermakna volume pembengkakan dan diameter kaki tikus, ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol dan pembanding. Penurunan volume pembengkakan terjadi pada kelompok fraksi air dosis I ($0,054 \text{ ml} \pm 0,0056$) dan II ($0,055 \text{ ml} \pm 0,0028$), dan tidak terdapat perbedaan bermakna dengan kelompok pembanding. Skoring makroskopik memperlihatkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol, pembanding, dan fraksi air dosis II, dan tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok pembanding dengan kelompok fraksi air dosis I (22,28 mg/kg bb) dan II (89,1 mg/kg bb). **Simpulan** : Fraksi air siwalan berefek anti artritis reumatoid pada model tikus yang diinduksi CFA.

Kata kunci : *Complete Freund's Adjuvants* (CFA), Siwalan, *Borassus flabellifer* L., *Artritis reumatoid*, inflamasi, skoring makroskopik

PENDAHULUAN

Artritis reumatoid adalah gangguan autoimun sistemik, ditandai dengan adanya artritis erosif pada sendi sinovial yang simetris dan kronis yang menyebabkan gangguan fungsi yang berat serta kecacatan. Kelainan ini dihubungkan dengan adanya manifestasi ekstraartikular dan autoantibodi terhadap immunoglobulin dalam sirkulasi, dikenal sebagai faktor reumatoid (*rheumathoid factor* [RF]).¹

Prevalensi di seluruh dunia sebesar 1% dan kebanyakan terjadi di awal usia 40-an, walaupun dapat juga timbul pada manula. Penyakit ini 2-3x lebih sering terjadi pada wanita, namun perbandingan antar jenis kelamin bervariasi sesuai dengan usia (pada usia 30 tahun, perbandingan wanita : pria adalah 10 : 1, pada usia 65 tahun 1 : 1).¹

Gejala prodromal klinik yang berkembang selama beberapa minggu hingga bulan dapat meliputi kelelahan, capek, demam tingkat bawah, hilang selera makan dan rasa sakit pada persendian. Keadaan ini mengganggu aktivitas sehari-hari penderita. Sampai saat ini terapi

Research Article

farmakologi untuk Artritis reumatoid adalah obat-obat golongan immunosupresan (misalnya azatioprin, metotreksat, siklosporin), obat anti inflamasi non steroid (misalnya diklofenak, indometasin, piroksikam, ketorolak) dan kortikosteroid (misalnya metilprednisolon dan deksametason). Pengobatan artritis reumatoid yang bersifat kronik ini, memberikan efek samping yang cukup banyak. Hal inilah yang mendorong peneliti untuk mencari kandidat dari bahan alam yang memiliki efek anti-artritis reumatoid yang efektif dan aman mengingat Indonesia memiliki sumber daya alam yang melimpah.

Penelitian ini dibagi dalam lima tahap. Tahap pertama adalah penyiapan ekstrak, fraksinasi ekstrak berdasarkan kepolaran (heksana, etil asetat dan air), serta karakterisasi profil kromatografi lapis tipis. Tahap kedua adalah induksi hewan uji menggunakan *Complete Freud's Adjuvant* (CFA) secara intraplantar. Tahap ketiga adalah skoring makroskopik jari/kaki yang bengkak. Tahap keempat adalah pengukuran volume pembengkakan telapak kaki (Plethysmometer) dan diameter pergelangan kaki yang diinduksi. Tahap kelima adalah pengamatan histologi berdasarkan keparahan sinovitis.

METODE

Bahan tumbuhan yang digunakan pada penelitian ini adalah daging buah siwalan (*Borassus flabellifer L*). Bahan kimia yang digunakan kecuali dinyatakan lain adalah berkualitas proanalisis, yaitu asam asetat anhidrid, asam asetat glasial, asam klorida, asam nitrat, asam sulfat, benzen, besi (III) klorida, bismuth (III) nitrat, etanol, eter, etilasetat, kalium iodida, kloroform, metanol, natrium hidroksida, formalin, n-butanol, natrium sulfat anhidrat, n-heksana, raksa (II) klorida, serbuk magnesium, serbuk seng, plat silika gel GF₂₅₄, timbal (II) asetat, tembaga sulfat, toluen, aquades, n-heksan. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat refluks, seperangkat alat KLT, seperangkat alat penetapan kadar air.

Hewan uji yang digunakan adalah tikus betina galur Wistar umur 8-10 minggu dengan berat 190-220 g sebanyak 16 ekor.

Tabel 1. Pengelompokkan Hewan Uji

Kelompok	Keterangan
Kontrol	Tikus + CFA
Pembanding	Tikus + CFA + Metilprednisolon
Fraksi air dosis I	Tikus + CFA + fraksi air dosis I (22,28mg/kg BB)
Fraksi air dosis II	Tikus + CFA + fraksi air dosis II (89,1 mg/kg BB)

Research Article

Uji anti-Artritis Reumatoid

Induksi tikus dilakukan dengan menganestesi tikus secara intra peritoneal menggunakan 5% kloralhidrat dosis 0,25 mg/g bb. Kemudian *Complete Freund's Adjuvants* (CFA) disuntikkan di bagian plantar telapak kanan bagian tungkai belakang sebanyak 0,25 ml.² Induksi dilakukan pada hari ke-1. Pengamatan efek anti-artritis reumatoid dilakukan terhadap parameter skoring makroskopik artritis, pengukuran volume telapak kaki dan pengukuran diameter pergelangan kaki kanan tikus dilakukan pada hari ke-1, 5, 10, 15 dan 21. Histologi jaringan tungkai belakang dilakukan pada hari ke-21 menggunakan pewarnaan Hematoxyllin-Eosin.

Tabel 2. Skoring Makroskopik³

Skor	Keterangan
0	tidak ada tanda artritis
1	bengkak/kemerahan pada telapak atau pada 1 jari
2	kemerahan/bengkak pada 2 sendi/otot
3	kemerahan/bengkak terjadi pada > 2 sendi
4	terjadi kemerahan/bengkak pada seluruh telapak, artritis lanjut/parah

Analisis Data

Data parametrik (volume dan diameter pergelangan kaki tikus) dianalisis menggunakan uji ANOVA satu arah dan untuk pengolahan data non parametrik (skoring makroskopik) dianalisis menggunakan Uji Kruskal-Wallis dan Uji Mann-Whitney U.⁴

Tabel 3. Pengukuran volume (ΔV) telapak kaki kanan tikus

Kelompok	ΔV (ml) \pm standar deviasi				
	Hari ke-1	Hari ke-5	Hari ke-10	Hari ke-15	Hari ke-21
CFA	0,027 \pm 0,0021	0,061 \pm 0,0057	0,055 \pm 0,0073	0,06 \pm 0,0042	0,052 \pm 0,0017
CFA+MPS	0,027 \pm 0,0021	0,053 \pm 0,0105	0,044 \pm 0,0046	0,050 \pm 0,0039	0,048 \pm 0,005
CFA+FA1	0,027 \pm 0,0006	0,055 \pm 0,0065	0,052 \pm 0,0056	0,054 \pm 0,0056	0,050 \pm 0,0043
CFA+FA2	0,027 \pm 0,0006	0,059 \pm 0,0069	0,052 \pm 0,0039	0,055 \pm 0,0028	0,054 \pm 0,0062

HASIL**Rendemen, skrining fitokimia, karakterisasi ekstrak dan fraksi air.**

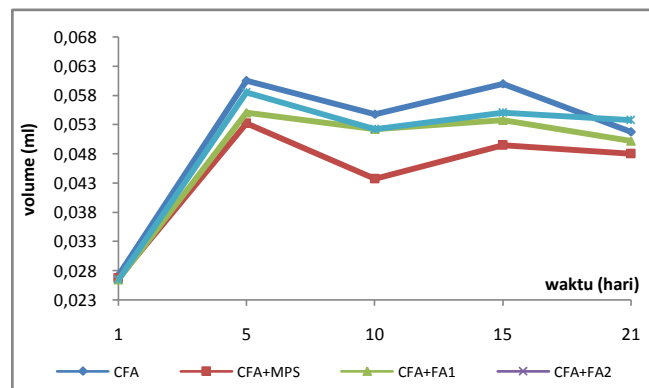
Dari 1,570 kg buah lontar segar didapatkan 99,7063 gram simplisia buah lontar kering. Rendemen dari 200 gram ekstrak untuk fraksi air adalah 35,62% (35,62 g).

Research Article

Analisis data inflamasi.

Berdasarkan hasil pengolahan data menggunakan metode ANOVA satu arah, pada hari ke-10 terdapat perbedaan bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok pembanding. Pada hari ke-15, terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol dan pembanding. Tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok fraksi air dosis I dan II. Namun terdapat kecenderungan ke arah penurunan volume pembengkakan kelompok fraksi air dosis I dan fraksi air dosis II.

Model hewan AR yang menggunakan CFA menyebabkan peningkatan Interferon α yang kemudian memacu makrofag pada infeksi lokal sehingga melepaskan melepaskan sitokin inflamasi seperti IL-1 dan TNF- α . Tumor nekrosis factor (TNF)- α memacu infiltrasi sel inflamasi, hiperplasia sinovium dan invasi pannus.⁵



Gambar 2. Grafik pengukuran volume inflamasi

Keterangan CFA = Complete Freund's Adjuvants; MPS = Metilprednisolon; FA1 = Fraksi Air dosis 1; FA2 = Fraksi Air dosis 2

Perubahan derajat pembengkakan pada articular terjadi oleh proliferasi sel pada sinovial yang berkembang menjadi hiperplasia dan hiperplastis. Hiperplasia pada sinovium dihubungkan dengan fibrosis dan perubahan derajat histologik sendi.⁶

Jika dibandingkan dengan volume kaki hari ke-15, pada hari ke-21 terdapat penurunan volume pembengkakan kaki pada seluruh kelompok perlakuan (tabel 3), walaupun tidak signifikan secara statistik.

Tabel 4. Persen Inhibisi

Kelompok	Persen inhibisi (%)			
	Hari ke-5	Hari ke-10	Hari ke-15	Hari ke-21
CFA+MPS	11,98	20,09	17,50	7,25
CFA+FA1	9,09	4,57	10,42	2,90
CFA+FA2	3,31	4,57	8,33	-3,86

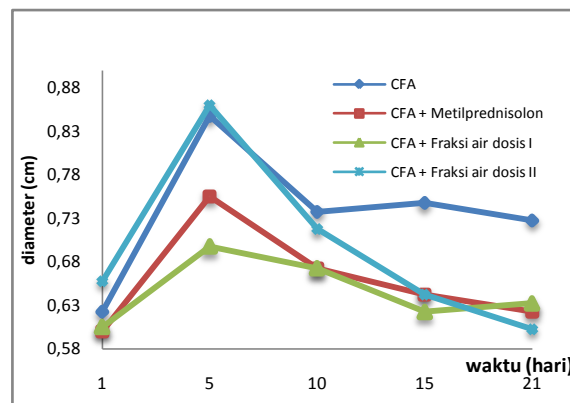
Keterangan CFA = Complete Freund's Adjuvants; MPS = Metilprednisolon; FA1 = Fraksi Air dosis 1; FA2 = Fraksi Air dosis 2

Research Article

Berdasarkan tabel 4, persen inhibisi kelompok fraksi air terbaik ditunjukkan oleh fraksi air pada hari ke-15 yaitu 10,42%.

Analisis data pengukuran diameter pergelangan kaki tikus.

Pada hari ke-5 terdapat perbedaan signifikan antara kelompok kontrol dengan dosis I. Pada hari ke-15 terdapat berdasarkan analisis ANOVA satu arah terdapat perbedaan yang signifikan (derajat kepercayaan 95%) antara kelompok kontrol dengan kelompok pembanding, kelompok fraksi air dosis I dan kelompok fraksi air dosis II.



Gambar 3. Grafik pengukuran diameter pergelangan kaki kanan tikus

Dan tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok pembanding dengan kelompok sediaan (fraksi air). Hal ini berarti bahwa kelompok sediaan dengan kelompok pembanding memiliki efek menurunkan diameter pergelangan kaki yang sama baiknya.

Tabel 5. Pengukuran diameter pergelangan kaki (cm)

Kelompok	Pengukuran kaliper (cm)				
	Hari ke-1	Hari ke-5	Hari ke-10	Hari ke-15	Hari ke-21
CFA	0,62 ± 0,078	0,85 ± 0,103	0,74 ± 0,022	0,75 ± 0,045	0,73 ± 0,126
CFA+MPS	0,60 ± 0,106	0,76 ± 0,047	0,67 ± 0,050	0,64 ± 0,051	0,62 ± 0,050
CFA+FA1	0,61 ± 0,041	0,70 ± 0,026	0,67 ± 0,061	0,62 ± 0,056	0,63 ± 0,063
CFA+FA2	0,66 ± 0,049	0,86 ± 0,059	0,72 ± 0,049	0,64 ± 0,026	0,60 ± 0,01

Keterangan CFA = Complete Freund's Adjuvants; MPS = Metilprednisolon; FA1 = Fraksi Air dosis 1; FA2 = Fraksi Air dosis 2

Skoring makroskopik. Berdasarkan analisis data menggunakan uji non parametrik Kruskal-Wallis, pada hari ke-15 terdapat perbedaan yang signifikan (Asymp. Sig. <0,05) antara kelompok kontrol dengan kelompok pembanding, kelompok fraksi air dosis II. Tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok pembanding dengan kelompok fraksi air dosis I dan II. Hal ini

Research Article

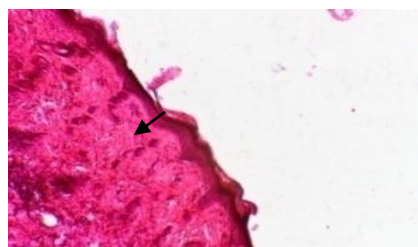
menunjukkan bahwa kelompok fraksi air dosis 22,28 mg/kg bb dan 89,1 mg/kg bb memiliki efek anti-arthritis reumatoid.

Tabel 6. Skoring makroskopik

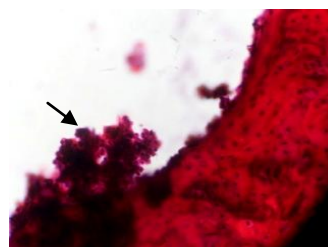
Kelompok	Skoring				
	Hari ke-1	Hari ke-5	Hari ke-10	Hari ke-15	Hari ke-21
CFA	1	3	3,25	4	3,5
CFA+MPS	1	1,75	2	3	1,5
CFA+FA1	1	2	2	2,75	2,25
CFA+FA2	1	2,75	3,25	3,25	2,75

Keterangan CFA = Complete Freund's Adjuvants; MPS = Metilprednisolon; FA1 = Fraksi Air dosis 1; FA2 = Fraksi Air dosis 2

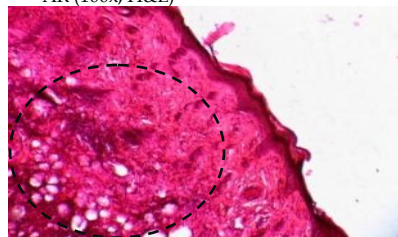
Histologi. Inflamasi kronik menyebabkan hipertropi dan penebalan pada membran sinovium, terjadi hambatan aliran darah dan nekrosis sel dan inflamasi berlanjut. Pembentukan pannus terjadi oleh penebalan sinovium yang dilapisi jaringan granular. Penyebaran pannus ke sinovium menyebabkan peradangan dan pembentukan jaringan parut memacu kerusakan sendi dan deformitas. Histologi yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan pewarnaan Hematoxyllin-Eosin. Induksi CFA pada kelompok kontrol menghasilkan penebalan pada membran sinovial (*thickening*) yang terlihat pada gambar 4a, terbentuknya pannus (gambar 4b), terjadi hiperplasia (sel-sel yang membesar) yang terlihat pada gambar 4c. Adanya sel polimorphonuklear pada gambar 4d menandakan terjadinya reaksi fagositosis terhadap induksi CFA.



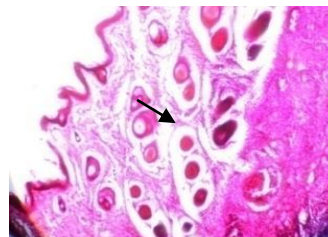
a. Kontrol; penebalan (panah) pada membran sinovium, yang merupakan ciri model penyakit AR (100x, H&E)



b. Terbentuknya pannus pada lekuk dalam membran sinovial (panah) (400X, H&E)



c. Terjadi hiperplasia pada tikus kontrol

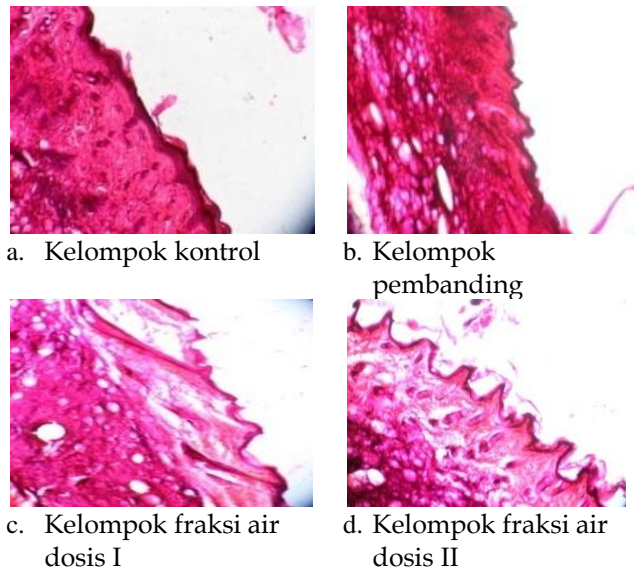


d. Terdapat sel-sel polimorphonuklear leukosit (PMN/PML) (400x, H&E)

Gambar 4. Histologi membran sinovial

Research Article

Berdasarkan hasil gambar 5, penebalan garis pada membran sinovial yang paling jelas terlihat adalah kelompok kontrol yang kemudian diikuti oleh kelompok fraksi air dosis II, lalu kelompok pembanding, lalu kelompok fraksi air dosis III dan terakhir adalah pembanding.



Gambar 5. Histologi masing-masing kelompok perlakuan

Berdasarkan histologi penebalan pada garis membran sinovial yang memberikan gambaran model AR yang telah diobati, terjadi pada kelompok fraksi air dosis I. Sinovium yang menebal kemudian dilapisi oleh jaringan granular yang disebut pannus. Pannus dapat menyebar ke seluruh sendi sehingga semakin merangsang peradangan dan pembentukan jaringan parut.

Hiperplasia terjadi pada keseluruhan kelompok. Sel-sel polimorfonuklear ada pada setiap kelompok perlakuan. Hasil histologi secara keseluruhan menggambarkan keberhasilan untuk modelling penyakit AR pada tikus galur Wistar dengan menggunakan CFA.

SIMPULAN

Siwalan merupakan salah satu tanaman tropik yang berpotensi sebagai anti-arthritis. Fraksi air siwalan memiliki efek anti-arthritis reumatoid pada model tikus adjuvant. Analisis KG-SM memberikan salah satu kemungkinan struktur pecahan fragmen dari fraksi air buah siwalan berupa senyawa gula (glikosida) dan alkaloid.

Research Article

DAFTAR PUSTAKA

1. Davey, P. At a glance medicine. Alih bahasa, Rahmalia, A., Novianty, C.; editor Safitri, Amalia. Erlangga. Jakarta. 2005. h 384
2. Suha A., et al. Anti-Arthritic Activity of the Methanolic Leaf Extract of *Urtica pilulifera* L. on Albino Rats. American Journal of Pharmacology and Toxicology. 2011. 6 (1): 27-32, ISSN 1557-4962
3. Henson, E.C., and J. G. Brunson. Ann. rheum. Dis. Studies of adjuvant-induced arthritis in the albino rat (CFN strain). Department of Pathology, University of Mississippi Medical Center, Jackson, Mississippi 39216. 1971. 29, 185.
4. Riwidikdo H., S.Kp. Statistika Kesehatan. Belajar mudah tehnik analisis data dalam Penelitian Kesehatan. Mitra Cendikia Press. Jogjakarta. 2007. Hlm 60-70, 140-149.
5. Plenge R.,M. Mapping Gen: TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis- a genomewide study. Am J. Med. .2007. 20 : 357-61
6. O'Dell J.R. Anticytokine therapy a new era in the treatment of rheumatoid arthritis. New Engl J. Med. 1999. 340: 310-312